

【書類名】 特許願

【整理番号】 255787

【提出日】 平成15年 7月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/00

【発明の名称】 プローブ担体およびその製造方法

【請求項の数】 22

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【氏名】 石橋 亨

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【氏名】 久家 克明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内

【氏名】 岡田 良克

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

【氏名又は名称】 キャノン株式会社

【代表者】 御手洗 富士夫

【代理人】**【識別番号】** 100090538**【住所又は居所】** 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社
内**【弁理士】****【氏名又は名称】** 西山 恵三**【電話番号】** 03-3758-2111**【選任した代理人】****【識別番号】** 100096965**【住所又は居所】** 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会
社内**【弁理士】****【氏名又は名称】** 内尾 裕一**【電話番号】** 03-3758-2111**【先の出願に基づく優先権主張】****【出願番号】** 特願2002-211147**【出願日】** 平成14年 7月19日**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 011224**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 9908388**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プローブ担体およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的物質と特異的に結合可能なプローブを固相担体に固定してなるプローブ担体であって、該プローブは前記プローブに結合したリンカー、前記リンカーに結合した第一の官能基、および前記第一の官能基に結合した第二の官能基、を介して前記担体に固定化されており、且つ前記第一及び前記第二の官能基の組み合わせは、酸性官能基及び塩基性官能基であることを特徴とするプローブ担体。

【請求項 2】 前記酸性官能基の解離定数が 1.0×10^{-12} 以上で、前記塩基性官能基の解離定数が 1.0×10^{-6} 以上の組み合わせであることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 3】 前記プローブがオリゴヌクレオチドもしくは核酸であることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 4】 前記オリゴヌクレオチドもしくは核酸の 3' 末端あるいは 5' 末端に前記リンカーを有することを特徴とする請求項 3 に記載のプローブ担体。

【請求項 5】 前記リンカーがメチレン鎖あるいは、ポリエーテル鎖であることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 6】 前記酸性官能基がメルカプト基であり、前記塩基性官能基がアミノ基であることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 7】 前記塩基性官能基が 1 級アミノ基もしくは 2 級アミノ基またはこれらの組み合わせよりなることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 8】 前記固相担体をシランカップリング剤で処理することで第二の官能基を導入することを特徴とした請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 9】 前記固相担体がガラス、石英、シリカのいずれかもしくは混合物であることを特徴とする請求項 8 に記載のプローブ担体。

【請求項 10】 前記第一および第二の官能基の組み合わせが、結合することによって、NMR スペクトルの化学シフトが互いにシフトする組み合わせである

請求項 1 に記載のプロープ担体。

【請求項 1 1】 請求項 1 に記載のプロープ担体に、検知物質を含む検体を付与する手段と、前記プロープ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知する手段とを備えることを特徴とする検知方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 1 記載の検知方法を用いた検知装置。

【請求項 1 3】 請求項 1 記載のプロープ担体の製造装置。

【請求項 1 4】 標的物質と特異的に結合可能なプロープを固相担体に固定する方法であって、第一の官能基を有するリンカーを有する該プロープを用意する工程と、第二の官能基を有する固定基材を用意する工程と、該固定基材に該プロープを付与する工程と、前記第二の官能基と前記第一の官能基を結合させる工程と、を有し、前記第一及び前記第二の官能基の組み合わせは、酸性官能基及び塩基性官能基であることを特徴とする固定方法。

【請求項 1 5】 前記酸性官能基の解離定数が 1.0×10^{-12} 以上で、前記塩基性官能基の解離定数が 1.0×10^{-6} 以上の組み合わせであることを特徴とする請求項 1 4 に記載のプロープ固定方法。

【請求項 1 6】 前記プロープがオリゴヌクレオチドもしくは核酸であることを特徴とする請求項 1 4 に記載のプロープ固定方法。

【請求項 1 7】 前記オリゴヌクレオチドもしくは核酸の 3' 末端あるいは 5' 末端に前記リンカーを有することを特徴とする請求項 1 6 に記載のプロープ固定方法。

【請求項 1 8】 前記リンカーがメチレン鎖あるいは、ポリエーテル鎖であることを特徴とする請求項 1 4 に記載のプロープ固定方法。

【請求項 1 9】 前記酸性官能基がメルカプト基であり、前記塩基性官能基がアミノ基であることを特徴とする請求項 1 4 に記載のプロープ固定方法。

【請求項 2 0】 前記塩基性官能基が 1 級アミノ基もしくは 2 級アミノ基またはこれらの組み合わせよりなることを特徴とする請求項 1 4 に記載のプロープ固定方法。

【請求項 2 1】 前記固相担体をシランカップリング剤で処理することで第二の官能基を導入することを特徴とした請求項 1 4 に記載のプロープ固定方法。

【請求項22】 前記固相担体がガラス、石英、シリカのいずれかもしくは混合物であることを特徴とする請求項21記載のプロープ固定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有効である多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）に関する。

【0002】

【背景技術】

標的物質と特異的に結合可能なプロープを基材上に固定する方法としてはさまざまな方法が知られている。詳細としては、基材上においてプロープの合成を行うことにより基材上に固定する方法と、予め用意されたプロープをピンもしくはスタンプなどにより基材上に付与することにより固定する方法とがある。

【0003】

基材上にてプロープの合成を行う固定方法としては、例えば、特許文献1に記載されているように、基体の選択された領域からアクチベーターによって保護基を除去し、除去可能な保護基を有するモノマーを前記領域に結合させることを繰返すことにより、基体上で種々の配列を有するポリマーを合成する方法が知られている。

【0004】

また、予め用意されたプロープを基材上に付与することにより固定する方法としては、例えば、特許文献2に記載されているように、基材及び該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることにより固定する方法が知られている。また、特許文献3に記載されているように、生物学的に活性な物質の検出において、カルボジイミドを有する化合物上にカルボジイミド基を介して固定化することを用いて検出する方法が知られている。

【0005】

更に、特許文献4には、末端部にチオール基を有するDNA断片と、チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基を有する鎖状分子が一方の末端で表面に固定された固相担体とを液相にて接触させることにより、DNA断片と鎖状分子との間で共有結合を形成させることによるDNA断片の固相担体表面への固定方法が記載されており、チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基としては、具体的にはマレイミジル基、 α 、 β -不飽和カルボニル基、 α -ハロカルボニル基、ハロゲン化アルキル基、アジリジン基およびジスルフィド基からなる群より選ばれる基を含む置換基であると記載されている。

【0006】

イオン結合を利用した固定方法は、アミノシランカップリング剤を固相に固定し、このアミノ基の正電荷と、オリゴヌクレオチドのリン酸部分の負電荷の相互作用によって固定する例もある（例えば、非特許文献1など）。

【0007】

【特許文献1】

米国特許第51438545号明細書

【特許文献2】

特開平8-23975号公報

【特許文献3】

特開平8-334509号公報

【特許文献4】

特開2001-178442号公報

【非特許文献1】

Analytical Biochemistry 292, 250-256

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特開2001-178442号公報に記載の固定方法は、固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤を固相担体表面に接触処理することで導入し、その後、シランカップリング剤と反応する末端とチオール基と反応する末端とを有する物質を反応させることで固相担体の表面を処理した

固相担体表面上に、チオール基を有するプローブを反応させることによって、固相担体表面にプローブを固定しており、つまり、チオール基を有するプローブを固相担体表面に固定するためには、固相担体表面をシランカップリング剤で処理したあとに、更に処理が必要であった。

【0009】

またアミノ基の正電荷と、オリゴヌクレオチドのリン酸部分の負電荷の相互作用を利用した方法では、リン酸基と基板上のアミノ基との結合状態が不確定であり、後述するハイブリダイゼーション反応やその後の洗浄工程で使用する溶液のイオン強度によって、プローブとの担体とのイオン結合が影響を受け、その後の分析結果に影響を与える場合があった。

【0010】

そこで本発明は、プローブを基材に固定するために行う処理工程数を削減し、簡便にかつ強固なプローブの固定を行うプローブ固定方法を提供する。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、本発明に係るプローブ担体は、標的物質と特異的に結合可能なプローブを固相担体に固定してなるプローブ担体であって、該プローブは前記プローブに結合したリンカー、前記リンカーに結合した第一の官能基、および前記第一の官能基に結合した第二の官能基、を介して前記担体に固定化されており、且つ前記第一及び前記第二の官能基の組み合わせは、酸性官能基及び塩基性官能基であることを特徴とする。

【0012】

また、本発明は、上記記載のプローブ固定方法に関する。

【0013】

また、本発明は、上記プローブ担体の製造装置に関する。

【0014】

また、本発明は、上記記載のプローブ担体に、検知物質を含む検体を付与し、前記プローブ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知する検知方法に関する。

。

【0015】

また、本発明は、上記記載のプロープ担体に、検知物質を含む検体を付与する手段と、前記プロープ担体上に結合した検体の前記検知物質を検知する手段とを備える検知装置に関する。

【0016】

また、本発明は、NMRを用いて利用可能な官能基の組み合わせを選び出す方法にも関する。

【0017】**【発明の実施の形態】**

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

【0018】

本発明は、a) リンカー、b) リンカーが有する第一の官能基、c) 第二の官能基を介して、標的物質と特異的に結合可能なプロープを固相担体に固定してなるプロープ担体及びプロープ固定方法についての発明である。

【0019】

固相担体としての基材は、プロープを固定し、得られたプロープ固定基材を用いて検知物質（標的物質）を検出するのに支障のないものであれば特に限定される物ではないが、特にリンカーに直接結合されていない第二の官能基を導入する際に、第二の官能基あるいは第二の官能基に導ける官能基を有するシランカップリング剤で基材を処理すると良い。基材は、シランカップリング剤との反応が効率的に進むものであれば特に限定されるものではなく、具体的には、石英、ガラス、シリカ、アルミナ、タルク、クレー、アルミニウム、水酸化アルミニウム、鉄、マイカなどが好ましいが、酸化チタン、亜鉛華、酸化鉄などの酸化物などを使用することもできる。また、標的物質の検出や材料としての汎用性を考慮すると、アルカリ成分などが含まれない無アルカリガラスもしくは石英基板材料が特に好ましい。

【0020】

基材に樹脂を用いるのであれば、樹脂をシラン化させるなどシランカップリング剤との親和性をよくする必要がある。シラン化させるためには、オレフィンと

ビニル基を持つシランカップリング剤を共重合させシラン化ポリオレフィンを生成させる方法や、あるいはカルボキシル基を持つポリマーの表面をエポキシ基を持つシランカップリング剤で処理する方法などがある。ただし、シラン化の方法やその他シランカップリング剤との親和性をよくすることができれば、これに限定される物ではない。

【0021】

また、官能基を持つ樹脂を表面処理して、塩基性あるいは酸性を示す第二の官能基へと変化させたり、側鎖あるいはポリマー末端に塩基性もしくは酸性を示す樹脂を使用しても良い。

【0022】

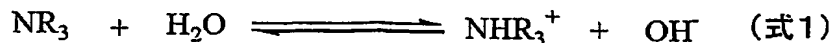
第二の官能基に塩基性を示す官能基として、代表的な官能基として、アミノ基がある。このアミノ基を選択した場合、アミノ基を有するシランカップリング剤としては、例えばN- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリアルコキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジアルコキシシラン、 γ -アミノプロピルトリアルコキシシラン、 γ -アミノプロピルメチルジアルコキシシラン、N, N-ジメチルアミノプロピルトリアルコキシシラン、N-メチルアミノプロピルトリアルコキシシラン、N-フェニル- γ -アミノプロピルトリアルコキシシランなどがあげられるが、それらに含まれるアミノ基がある程度の塩基性度を有する方が望ましい。特にプローブにメルカプト基を用いた場合は、アミノ基の解離定数が 1.0×10^{-6} 以上あれば好適である。さらには反応性を考えると立体障害の小さい1級乃至は2級アミノ基が好適である。アルコキシシリル基としては、加水分解が速やかに行えるメトキシシリル基もしくはエトキシシリル基が好ましい。

【0023】

なお、例えばアミノ基のようなブレンステッド塩基の性質を有する置換基の場合、その水中での解離定数は式1に示したような平衡式の平衡定数(式2)で表される。

【0024】

【外1】



【0025】

R=Hもしくはアルキル、アリール等の有機置換基

【外2】

$$K = \frac{[\text{NHR}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{NR}_3]} \quad (\text{式2})$$

【0026】

このように塩基性シランカップリング剤を用いた場合は、リンカーを介し酸性官能基をもつプローブとイオン結合する。例えば、酸性官能基としてはメルカプト基（-SH）、スルホナト基（-SO₃⁻）、カルボキシル基（-COOH）などがあげられる。特にJournal of Colloid and Interface Science 195, 338-342 (1997)にあるようにアミノ基とメルカプト基との組み合わせは比較的強固なイオン結合となる。

【0027】

また、逆に第二の官能基として、カルボキシル基やメルカプト基などの酸性基を有する、もしくは導くことが可能な官能基を有するシランカップリング剤で固相担体进行处理し、リンカーを介し塩基性官能基をもつプローブとイオン結合させる方法もある。ただし、メルカプト基の場合、ジスルフィド結合により二量化しやすいため、還元剤を加えるなどして二量化を抑えることが好ましい。

【0028】

また、本発明において、核酸を有する核酸プローブを用いる場合は、いずれか一方の酸性基は、核酸プローブを構成するリン酸基よりも酸性度の高い官能基を用いると良い。これにより、リン酸基とアミノ基が解離するような条件下であっても、固相にプローブを固定したまま保持できる。すなわち、ハイブリダイゼーション時の厳しい処理を行っても好適な分析結果を得ることが可能な好適なチップを提供できる。

【0029】

なお、本発明におけるシランカップリング剤とは、樹脂などの有機化合物と反応しうる有機官能基と、ガラスなどの無機化合物とシロキサン結合を介して結合しうる部分を併せ持つ化合物のことを言う。

【0030】

基材の形状は制約されるものではないが、DNAチップを例にあげるならば検出方法および装置などの汎用性から基板状であることが好ましい。更に、基板材料は、表面の平滑性が高い基板材料であることが好ましく、具体的には *1 inch* × *3 inch*、厚さ *0.7* ~ *1.5 mm* 程度の基板であることが好ましい。

【0031】

上記基材の表面をシランカップリング剤で処理する際には、基材上を予め洗浄しておくことが好ましい。洗浄方法としては、水による洗浄、薬液による洗浄、プラズマによる洗浄、UVオゾンによる洗浄など多くの方法が知られているが、簡易的に尚且つ均一に洗浄する方法としては、薬液による洗浄方法が適当である。基材の種類によっても好適な洗浄方法は異なるが、例えば基材としてガラスを用いる場合は、所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いて基材表面を十分に洗浄し、基材上に付着した汚れを除去する方法が挙げられる。具体的に述べるのであれば、*60* °C 程度に加温した *1 mol/l* 水酸化ナトリウム水溶液を用意し、水溶液中で基材表面をワイピングするもしくは水溶液をシャワーリングしながらブラッシングすることにより基材上に付着した汚れを確実に除去する。汚れを除去した後、余分な水酸化ナトリウム分を十分に水で洗い流す。最後に *N₂* などの不活性ガスでブローするなどの方法で水分除去を行う。

【0032】

シランカップリング剤のコーティングの方法としては、浸漬法（ディッピング法）、スピンコート法、スプレーコート法、水面キャスト法などの方法が利用できるが、特に簡便且つ均一に処理できる浸漬法が好ましい。この場合、濃度が *0.1* ~ *2.0* 重量%の水に溶解させたシランカップリング剤水溶液に、洗浄した基材を浸漬し、反応終了後余分なシランカップリング剤を含む溶液を洗い流すことで処理をすることが好ましいが、濃度やコーティングの方法は、特に限定されるものではない。

【0033】

また、基材から余分なシランカップリング剤を除去し、100～120℃くらいの温度で乾燥させることが好ましい。

【0034】

アミノシランカップリング剤を例に挙げると、このように基材に固定されたシランカップリング剤の持つ塩基性のアミノ基はプローブにリンカーを介して導入された酸性の置換基であるメルカプト基と水素結合、もしくはアミノ基のプロトン化を伴い、イオン結合的に相互作用することが出来、これによってプローブは基材上に固定される。そのためシランカップリング剤の持つアミノ基がある程度の塩基性度を有する方が望ましい。

【0035】

塩基性のアミノ基とプローブに導入された酸性の置換基であるメルカプト基との相互作用はNMRスペクトルで簡便に観測することが出来る。よって基材表面に導入するのに適した塩基性を有するアミノ基を簡便に評価するためにNMRスペクトルを用いることができる。すなわちメルカプト基を導入したプローブを模した、例えばプロパンチオールのようなアルキルチオールとプローブを固定するのに適すると思われるアミノシランカップリング剤もしくはそれを模した、例えばN-プロピルエチレンジアミンのようなアミン化合物を重水のようなプロトン性溶媒中で混合しNMRスペクトルを観測すると、アミン化合物に帰属されるシグナルの化学シフト値には著しい低磁場シフトが観測され、一方、チオールに帰属されるシグナルの化学シフト値には著しい高磁場シフトが観測される。また、二次元NMRスペクトルを測定することで上記アミン化合物とアルキルチオールの相互作用も観測できる。これらの変化を示すアミン化合物に対応するアミノ基はメルカプト基を導入したプローブを固定するのに適した塩基性を有する基である。さらに用いたアミン化合物の塩基性度の高さを直接評価することによっても選定することができる。

【0036】

また、本発明に使用されるプローブとしては、タンパク質（複合タンパク質を含む）、核酸、糖鎖（複合糖質を含む）、脂質（複合脂質を含む）等の生体高分

子などが含まれる。具体的には、酵素、ホルモン、フェロモン、抗体、抗原、ハプテン、ペプチド、合成ペプチド、DNA、合成DNA、RNA、合成RNA、PNA、合成PNA、ガングリオシド、レクチンなどがあげられる。媒体中に含まれるプローブの量としては、例えば核酸プローブの場合、プローブ安定性を考慮すると、媒体中には例えば2mer~500mer、特に2mer~80merの核酸プローブを、 $0.05 \sim 500 \mu\text{mol/l}$ 、特に $0.5 \sim 50 \mu\text{mol/l}$ の濃度となるように調整することが好ましい。

【0037】

プローブに第一の官能基を導入する場合には、リンカーを介して導入する。ここで言うリンカーとは、プローブと第一の官能基の間にあって、プローブと第一の官能基とをつなげるものを言う。このような目的を達成するリンカーであれば限定はされないが、メチレン鎖あるいはポリエーテル鎖が好適である。さらには、リンカーの長さが1乃至は20原子の直鎖状のものが好ましい。

【0038】

この導入には、プローブと反応する官能基と第一の官能基の間にリンカーを持つ化合物を用意し、プローブと反応させる。この場合、第一の官能基がプローブとの反応に関与しないようにするため、予め保護機で保護しておくことが好ましく、プローブとの反応終了後に第一の官能基の保護機を脱保護する。

【0039】

具体的には、自動合成するDNAプローブの5'末端にメルカプト基を導入する際、DNA自動合成機での合成時に5'-Thiol-Modifier C6（グレンリサーチ（GlenResearch）社製）などを用いる事ができる。また、アミノ基を導入する場合には、DNA自動合成機での合成時に5'-Amino-Modifier 5（グレンリサーチ（GlenResearch）社製）などを用いる事ができる。

【0040】

なお、効率良くメルカプト基を始めとした第一の官能基を導入することができれば、導入法やリンカーの種類などは特に限定されるものではない。

【0041】

本発明に係る塩基性官能基と、酸性官能基との組み合わせによって、完全な共有結合とは異なり、静電的に結合することにより、固相にプローブが固定される。本発明における酸性官能基と塩基性官能基との組み合わせにおいて、固相に固定化されたプローブが分析中に解離しないことが重要である。例えばプローブに核酸を固定化させ、標的核酸とのハイブリタイゼーション反応を検出する場合においては、ハイブリダイゼーション時、およびハイブリダイゼーション後の洗浄工程におけるpH条件や、塩濃度、温度条件においても、常に安定して結合されていることが重要である。この目的のために、従来は共有結合によってプローブと固相との間に強固な結合を生じさせていた。しかし、本発明者らの検討を行った結果、共有結合を生じさせずとも、比較的強固な静電結合を生じさせることによって、この目的が達成されるという知見を得た。この知見に基づいて本発明はなされている。

【0042】

上述の比較的強固な静電結合を生じさせるためには、酸性官能基の解離定数が 1.0×10^{-12} 以上で、前記塩基性官能基の解離定数が 1.0×10^{-6} 以上の組み合わせの官能基を用いることが好ましい。

【0043】

プローブの付与は、プローブを水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、インクジェット法、ピン法あるいはピン&リング法などにより塩基性基を有する基材にスポットする。

【0044】

ただし、これらの方法に限るものではなく、フォトリソグラフィー技術を利用したものであっても良い。また、スポットの形状も、円、四角形、多角形、等様々な様態をとることができる。スポット径の大きさとしては、 $5 \mu\text{m} \sim 500 \mu\text{m}$ であると良い。

【0045】

スポッティング方法に関し、上述した方法の中でも特にインクジェット法は高密度で尚且つ正確なスポッティングができることから好適なスポッティング方法である。インクジェット法とは、ごく細いノズルの中にプローブを含む溶媒を入

れ、ノズルの先端近くを瞬間的に加圧ないし加熱し、ノズルの先端から正確に極微量のプロープを含む溶媒を飛び出させ、空間を飛翔させて基材面に付着させるというものである。

【0046】

インクジェット法によるスポッティング方法において、プロープ媒体に含まれる成分はプロープ媒体としてインクジェットヘッドから吐出させた時にプロープに対して実質的に影響を与えないものであって、且つインクジェットヘッドを用いて基材上に正常に吐出可能である媒体組成を満たすものであれば、特に限定されるものではない。例えば、インクジェットヘッドが媒体に熱エネルギーを付与して吐出させる機構を備えるバブルジェット（R）ヘッドである場合、グリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコール、アセチレンアルコールを含む液体はプロープ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的に述べるのであれば、グリセリン5～10重量%、チオジグリコール5～10重量%、アセチレンアルコール0.5～1重量%を含む液体がプロープ媒体として好適に用いられる。また、インクジェットヘッドが圧電素子を用いて媒体を吐出させるピエゾジェットヘッドである場合、エチレングリコール、イソプロピルアルコールを含む液体はプロープ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的には、エチレングリコール5～10重量%、イソプロピルアルコール0.5～2重量%を含む液体がプロープ媒体として好適に用いられる。

【0047】

このようにして得られたプロープ媒体をインクジェットヘッドより吐出させ基材上に付着させた時、スポットの形状が円形で、また吐出された範囲が広がることがない。高密度にプロープ媒体をスポッティングした場合にも、隣接するスポットとの連結を有効に抑えることができる。なお、本発明のプロープ媒体の特性は上記のものに限定されるものではない。

【0048】

また、予めプロープとプロープに導入した有機官能基と相互作用を持つシランカップリング剤を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、インクジェット法もしくはピン法などの方法により、基材表面に接触させ、基材への有機官能基の

導入と、プローブの固定を同時に行っても良い。

【0049】

さらにスポットのプローブの乾燥を低減するために、プローブが溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、プローブが溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、チオジグリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、パオゲン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、デキストラン、プルラン、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。高沸点の物質としては、エチレングリコールまたはジエチレングリコールを用いることがさらに好ましい。高沸点の物質の濃度は、プローブの水性液中、0.1～10容量%の範囲にあることが好ましい。また、プローブを付与した後の固相担体を、90%以上の湿度および20～50℃の温度範囲の環境にいてもよい。

【0050】

スポットティング後、過剰のプローブを洗浄して除去することが好ましい。プローブの種類にもよるが、アミノシランカップリング剤で処理した固相担体とメルカプト基を導入した1本鎖DNAプローブを用いた場合1分以内でプローブは固定されるが、10分以上放置した後に除去することが好ましい。

【0051】

このようにして得られたプローブ固定基材は、標的物質を検出するためのプローブ固定基材として好適である。

【0052】

ここで、このプローブ固定基材を用いて、例えば標的物質の検出等を行う場合の検出精度（S/N比）の向上を図ることを目的として、プローブを固相表面に固定した後、基材上のプローブ非結合部分が検体（サンプル）中に含まれる標的物質等と結合しないようにブロッキングを行っても良い。ブロッキングは例えば

、基材を0.5～2%ウシ血清アルブミン水溶液中に、10分から2時間程度浸すことにより行なわれる。

【0053】

しかし、このブロッキング操作は第二の官能基によって最適な方法や条件は異なる。例えば、基材表面にアミノ基が存在する場合は上述したウシ血清アルブミン水溶液を用いたブロッキング方法も有効ではあるが、ターゲットとアミノ基とのイオン結合を防ぐ目的で無水酢酸や無水コハク酸などの酸無水物で処理し、アミノ基をキャッピングする方法がある。ただし、一般に例えば核酸やオリゴヌクレオチドなどの標的物質と基板のアミノ基とのイオン結合は本発明による結合に比べて弱い結合であるため、ハイブリダイゼーション後にイオン強度の強い液で洗浄をすることでターゲットと基材とのイオン結合は、選択的に除去することも可能である。

【0054】

なお、これらのブロッキングの工程は必要に応じて行えば良く、例えばサンプルのプロープ固定基材への供給を各々のスポットに対して限定的に行い、スポット以外の部位へのサンプルの付着が実質的にない場合には行わなくても良い。スポット以外の部位へのサンプルが付着される場合においては基材となる材料や、第二の官能基の種類によって異なる。また、基材がガラス、石英などである場合において、塩基性基を有するシランカップリング剤のような物質とメルカプト基を有するプロープを含むプロープ媒体をスポッティングする場合にも、ブロッキング操作は必要ない。

【0055】

この様にして作製するプロープ固定基材はその用途に応じて、例えば同じプロープを含む複数のスポットを有するように構成しても良く、また異種のプロープを各々含む複数のスポットを有する様に構成してもよい。プロープの種類、数量、配置は必要に応じて適宜変更することが可能である。そしてこの様な方法によってプロープが高密度に配置されたプロープ固定基材は、その後標的物質の検出や、標的物質塩基配列の特定等に用いられる。例えばサンプル中に含まれている可能性のある、塩基配列が既知の標的物質である一本鎖核酸の検出に用いる場合

には、標的物質の一本鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして用い、プローブを含む複数のスポットが固相上に配置されているプローブ固定基材を用意し、プローブ固定基材の各々のスポットに、検知物質を含むサンプルを付与して該標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を特に限定されないが、例えば蛍光、発光、電流もしくはラジオアイソトープによる検出等の既知の方法で検出する。それによって、サンプル中における標的物質の有無の検出を行うことができる。

【0056】

また、サンプル中に含まれている標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の特定に用いる場合には、標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の複数の候補を設定し、塩基配列群に対して各々相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして基材上にスポッティングする。次いで、各々のスポットにサンプルを供給して標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。これにより、標的物質の一本鎖核酸の塩基配列の特定を行うことができる。また本発明に係わるプローブ固定基材の他の用途としては、例えばDNA結合蛋白質が認識する特異的な塩基配列のスクリーニングやDNAに結合する性質を有する化学物質のスクリーニングへの適用が考えられる。

【0057】

ハイブリダイゼーションは標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に付与することによって実施することが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃の温度範囲で、そして2～20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0058】

DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。1塩基ミスマッチ（1塩基変異）の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を2種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

【0059】

以下、実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明する。

【0060】

【実施例】

[実施例1]

(1) 基材の作製

スライドガラスを予め60℃に加温した1mol/l水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を10分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にスライドガラスを浸漬し、超音波洗浄を10分間行った。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着したパーティクルを水洗、除去した。その後、このスライドガラスをスピンドライで乾燥させた。

【0061】

アミノシランカップリング剤（商品名：KBM-603；信越化学工業（株）社製）を1重量%になるように水に溶解して30分間攪拌し、この水溶液にスライドガラスを30分間浸漬させた後取り出して水で洗浄し、オープン中に入れ120℃で1時間乾燥させた。

【0062】

(2) プロープの合成

本実施例においてプローブは、検出しようとする標的核酸の全部または一部に対して相補的な塩基配列を有し、該標的核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズ（交雑反応）することで該標的核酸を検出する1本鎖核酸を用いた。DNA自動合成機を用いて配列番号1および、配列番号1と1塩基のみ異なる配列番号2の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号1および配列番号2の一本鎖DNA末端にはDNA自動合成機での合成時にチオールモディファイア（Thio1-Mo d i f i e r）（グレンリサーチ（G l e n R e s e a r c h）社製）を用いる事によってメルカプト基を導入した。続いて通常の脱保護を行い、DNAを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。

5' HS- (CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTTTA
CA3'（配列番号：1）

5' HS- (CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCCTCGTTTTA
CA3'（配列番号：2）。

【0063】

（3）プローブの固定

上記（2）で合成した2種のDNA断片（配列番号：1および配列番号：2）それぞれをグリセリン7.5重量%、尿素7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールE100；川研ファインケミカル（株）社製）1重量%を含む水溶液に、0.6ODになるよう溶解させた。なお、オリゴヌクレオチドを1mlに溶解し、1cmの光路長のセルにおいて260nmの吸光度が1となる量が1ODである。

【0064】

これらのDNA断片を含む水溶液それぞれをバブルジェット（R）プリンター（商品名：BJ-F850；キヤノン（株）社製を平板への印刷が可能なように改造を施したもので、BJヘッドとスライドガラスの間隔は約1mm、吐出量は約4plである。）で、上記（1）の方法によって作製したスライドガラスに別々にスポッティングした。この際、15倍のルーペによる観測ではサテライトスポット（液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット）は観測されなかった。

【0065】

プローブを含む溶液をスポッティングしたスライドガラスを室温で10分間放置し、1M NaCl / 50mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で洗浄した。

【0066】

(4) ブロッキング・ハイブリダイゼーション反応

1M NaCl / 50mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に1.0重量%になるようウシ血清アルブミンを溶解させ、上述の方法で作製したDNAチップを室温で2時間浸漬させ、ブロッキング反応を行った。

【0067】

配列番号1のプローブと相補的な核酸配列を有するDNA断片の5'末端にローダミンを結合させて標識化したDNA断片を合成し、これを1M NaCl / 50mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に50nMになるように溶解させた。ブロッキング処理を行ったDNAチップをこの標識化したDNA断片を含む溶液に浸漬し、45℃で2時間放置した。その後、1M NaCl / 50mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で未反応のDNA断片を洗浄し、さらに純水で洗浄を行った。

【0068】

(5) 結果

ハイブリダイゼーションを行ったDNAチップを蛍光スキャナ (商品名: GenePix 4000B; Axon Instruments, Inc. 製) で波長532nmの蛍光観測を行った。その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45μmであった。そしてPMT400V, レーザーパワー100%で測定した場合に、配列番号1のプローブに起因する蛍光強度は21692であり、1塩基ミスマッチである配列番号2のプローブに起因する蛍光強度は13346であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は419であった。これにより、1塩基ミスマッチも検出できることが明らかとなった。

【0069】

[実施例2]

(1) 基材の作製

アミノシランカップリング剤として商品名: KBM-903 (信越化学工業 (

株) 社製) を用いた以外は、実施例 1 と同様にして基材を作製した。

【0070】

(2) プローブの固定

配列番号 1 のプローブを 0.6 OD になるよう、グリセリン 7.5 重量%、尿素 7.5 重量%、チオジグリコール 7.5 重量%、アセチレンアルコール (商品名: アセチレノール E 100; 川研ファインケミカル (株) 社製) 1 重量%を含む水溶液に溶解させ、同様の方法でスポッティングをした。

【0071】

(3) ブロッキング・ハイブリダイゼーション反応

実施例 1 と同様にブロッキング・ハイブリダイゼーション反応を行った。

【0072】

(4) 結果

各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は $45\ \mu\text{m}$ である。そして蛍光強度は PMT 400 V, レーザーパワー 100% で測定した場合に、29998 であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は 393 であった。

【0073】

[実施例 3]

アミノシランカップリング剤として商品名: KBM-602 (信越化学工業 (株) 社製) を用いた以外は、実施例 2 と同様にして DNA チップを作製し、ブロッキング反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光を観察した。

【0074】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は $40\ \mu\text{m}$ である。そして蛍光強度は PMT 400 V, レーザーパワー 100% で測定した場合に、20675 であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は 442 であった。

【0075】

[実施例 4]

アミノシランカップリング剤として N-メチルアミノプロピルトリメトキシシラン (チッソ (株) 社製) を用いた以外は、実施例 2 と同様にして DNA チップ

を作製し、ブロッキング反応、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光を観察した。

【0076】

その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は $50\mu\text{m}$ である。そして蛍光強度はPMT 400 V, レーザーパワー 100 %で測定した場合に、22246であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は212であった。

【0077】

[実施例5]

(1) 基材の作製

スライドガラスを予め 60°C に加温した 1mol/l 水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を10分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にスライドガラスを浸漬し、超音波洗浄を10分間行った。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、スライドガラスに付着したパーティクルを水洗、除去した。その後、このスライドガラスをスピンドライで乾燥させた。

【0078】

(2) プロブの固定

アミノシランカップリング剤（商品名：KBM-603；信越化学工業（株）社製）を1重量%になるよう、グリセリン7.5重量%、尿素7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールE100；川研ファインケミカル（株）社製）1重量%を含む水溶液に、溶解させ、20分間攪拌した。続いて合成したDNA断片（配列番号：1）を、このシランカップリング剤を含む溶液に0.6ODになるよう溶解させた。

【0079】

このシランカップリング剤とDNA断片を含む溶液をバブルジェット（R）プリンター（商品名：BJ-F850；キヤノン（株）社製を平板への印刷が可能なように改造を施したもの）で、上記（1）の方法によって作製したスライドガラスにスポッティングした。この際、15倍のルーペによる観測ではサテライト

スポット（液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット）は観測されなかった。

【0080】

シランカップリング剤とプローブを含む溶液をスポットティングしたスライドガラスを室温で20分間放置し、1MNaCl/50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）で洗浄した。

【0081】

（3）ハイブリダイゼーション反応

配列番号1と相補的な核酸配列を有するDNA断片の5'末端にローダミンを結合させて標識化したDNA断片を合成し、これを1MNaCl/50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）に50nMになるように溶解させた。このDNAチップをこの標識化したDNA断片を含む溶液に浸漬し、45℃で2時間放置した。その後、1MNaCl/50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）で未反応のDNA断片を洗浄し、さらに純水で洗浄を行った。

【0082】

（4）結果

ハイブリダイゼーションを行ったDNAチップを蛍光スキャナ（商品名：GenePix4000B；Axon Instruments, Inc. 製）で波長532nmの蛍光観測を行った。その結果、各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は45μmである。そして蛍光強度はPMT400V、レーザーパワー100%で測定した場合に、4831であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は84であった。

【0083】

これにより、第二の官能基を基材に導入するためのシランカップリング剤とプローブを同時に基材に付与した場合は、ブロッキング操作が不必要であることがわかった。

【0084】

〔実施例6〕

（1）基材の作製

メルカプトシランカップリング剤として商品名：A-189（日本ユニカー（株）社製）を0.1重量%になるようにpH4の塩酸水溶液に溶解して5時間攪拌し、この水溶液を、実施例1記載の方法で洗浄したスライドガラスにスピコートし、オープン中に入れ110℃で30分間乾燥させた。

【0085】

（2）プローブの固定

アミノ基で修飾した配列番号3のプローブを0.6ODになるよう、グリセリン7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールE100；川研ファインケミカル（株）社製）0.01重量%を含む水溶液に溶解させ、実施例1と同様の方法でスポッティングをした。

5' H₂N-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTTTTACA3'（配列番号：3）

（3）ブロッキング・ハイブリダイゼーション反応

実施例1と同様にブロッキング・ハイブリダイゼーション反応を行った。

【0086】

（4）結果

各々のスポットがほぼ円形であり、その直径は30μmである。そして蛍光強度はPMT700V，レーザーパワー100%で測定した場合に、1700であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は63であった。

【0087】

【実施例7】

（1）基材の作製

実施例5と同様の方法で基板を作成した。

【0088】

（2）プローブの固定

メルカプトシランカップリング剤（商品名：A189；日本ユニカー（株）社製）を0.1重量%になるよう、グリセリン7.5重量%、チオジグリコール7.5重量%、アセチレンアルコール（商品名：アセチレノールE100；川研ファインケミカル（株）社製）1重量%を含む水溶液に塩酸を加えpH4に調製し

た溶液に溶解させ、1時間攪拌した。続いて合成したDNA断片（配列番号：3）を、このシランカップリング剤を含む溶液に0.6ODになるよう溶解させた。

【0089】

このシランカップリング剤とDNA断片を含む溶液をバブルジェット（R）プリンター（商品名：BJ-F850；キヤノン（株）社製を平板への印刷が可能のように改造を施したもの）で、上記（1）の方法によって作製したスライドガラスにスポッティングした。この際、15倍のルーペによる観測ではサテライトスポット（液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット）は観測されなかった。

【0090】

シランカップリング剤とプローブを含む溶液をスポッティングしたスライドガラスを室温で20分間放置し、80℃のオーブンに30分放置し、1MNaCl/50mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）で洗浄した。

【0091】

（3）ハイブリダイゼーション反応

実施例5と同様の方法でハイブリダイゼーション反応を行った。

【0092】

（4）結果

ハイブリダイゼーションを行ったDNAチップを蛍光スキャナ（商品名：GenePix4000B；Axon Instruments, Inc. 製）で波長532nmの蛍光観測を行った。その結果、各々のスポットがほぼ円形である。そして蛍光強度はPMT400V、レーザーパワー100%で測定した場合に、4527であった。また、スポット周囲のバックグラウンドの蛍光強度は32であった。

【0093】

〔実施例8〕

アミノシランカップリング剤の有するアミノ基とプローブが持つメルカプト基との間の相互作用の有無を、メルカプト基を導入したプローブを模したアルキル

チオール（1-プロパンチオール）とKBM-603およびKBM-602のアミノ基部位を模したアミン化合物、N-プロピルエチレンジアミンを用いてNMRスペクトルを用いて観測した。

(1) 試料の調整

N-プロピルエチレンジアミン（アクロス社製）のD₂O（アルドリッチ社製）溶液（600 μ l）を5mm ϕ のNMRチューブに入れ、1-プロパンチオール（東京化成社製）をN-プロピルエチレンジアミンとのモル比にしておよそ1:1になるように加え、¹H NMRスペクトルでその変化を観察した。

(2) 結果

以下にN-プロピルエチレンジアミンと1-プロパンチオールおよび両者を混合した後の各々の化学シフト値を示す。

¹H NMRスペクトルデータ（400MHz, D₂O, 室温）

N-プロピルエチレンジアミン

δ / ppm

- 0.79（プロピル基のメチル水素）
- 1.37（プロピル基の β 位のメチレン水素）
- 2.42（プロピル基の α 位のメチレン水素）
- 2.51（NH₂基の β 位のメチレン水素）
- 2.61（NH₂基の α 位のメチレン水素）

1-プロパンチオール

δ / ppm

- 0.87（プロピル基のメチル水素）
- 1.53（プロピル基の β 位のメチレン水素）
- 2.45（SH基に隣接したメチレン水素）

各々を混ぜ合わせた後のN-プロピルエチレンジアミン

δ / ppm

- 0.81（プロピル基のメチル水素）
- 1.43（プロピル基の β 位のメチレン水素）
- 2.54（プロピル基の α 位のメチレン水素）

2. 63-2. 66 (NH₂基の β 位のメチレン水素)

2. 68-2. 71 (NH₂基の α 位のメチレン水素)

各々を混ぜ合わせた後の1-プロパンチオール

δ / ppm

0. 82 (プロピル基のメチル水素)

1. 42 (プロピル基の β 位のメチレン水素)

2. 33 (SH基に隣接したメチレン水素)

この結果、モデル化合物であるアミンとチオールの両者を混ぜることによってN-プロピルエチレンジアミンに帰属されるシグナルはその化学シフトが低磁場シフトし、1-プロパンチオールに帰属されるシグナルはその化学シフトが高磁場シフトするという変化が観測された。特にアミノ基およびメルカプト基に近い部位のシグナルはよりそのシフト量が大きくアミノ基に近いシグナルにはそのカップリングにも変化が観測された。

【0094】

[実施例9]

アミノシランカップリング剤の有するアミノ基とプローブが持つメルカプト基との間の相互作用の有無を、メルカプト基を導入したプローブを模したアルキルチオール(1-プロパンチオール)とKBM-903のアミノ基部位を模したアミン化合物、プロピルアミンを用いてNMRスペクトルを用いて観測した。

【0095】

(1) 試料の調整

プロピルアミン(東京化成社製)のD₂O(アルドリッチ社製)溶液(600 μ l)を5mm ϕ のNMRチューブに入れ、1-プロパンチオール(東京化成社製)をプロピルアミンとのモル比にしておよそ1:1になるように加え、¹H NMRスペクトルでその変化を観察した。

【0096】

(2) 結果

以下にプロピルアミンと1-プロパンチオールおよび両者を混合した後の各々の化学シフト値を示す。

^1H NMRスペクトルデータ (400MHz, D_2O , 室温)

プロピルアミン

δ / ppm

- 0.81 (プロピル基のメチル水素)
- 1.37 (プロピル基の β 位のメチレン水素)
- 2.51 (プロピル基の α 位のメチレン水素)

1-プロパンチオール

δ / ppm

- 0.87 (プロピル基のメチル水素)
- 1.53 (プロピル基の β 位のメチレン水素)
- 2.45 (SH基に隣接したメチレン水素)

各々を混ぜ合わせた後のプロピルアミン

δ / ppm

- 0.86 (プロピル基のメチル水素)
- 1.50 (プロピル基の β 位のメチレン水素)
- 2.72 (プロピル基の α 位のメチレン水素)

各々を混ぜ合わせた後の1-プロパンチオール

δ / ppm

- 0.84 (プロピル基のメチル水素)
- 1.45 (プロピル基の β 位のメチレン水素)
- 2.36 (SH基に隣接したメチレン水素)

この結果、モデル化合物であるアミンとチオールの両者を混ぜることによってプロピルアミンに帰属されるシグナルはその化学シフトが低磁場シフトし、1-プロパンチオールに帰属されるシグナルはその化学シフトが高磁場シフトするという変化が観測された。特にアミノ基およびメルカプト基に近い部位のシグナルはよりそのシフト量が大きかった。

【0097】

〔実施例10〕

アミノシランカップリング剤の有するアミノ基とプローブが持つメルカプト基

との間の相互作用の有無を、メルカプト基を導入したプローブを模したアルキルチオール（1-プロパンチオール）とN-メチルアミノプロピルトリメトキシシランのアミノ基部位を模したアミン化合物、N-メチルプロピルアミンを用いてNMRスペクトルで観測した。

(1) 試料の調整

N-メチルプロピルアミン（アルドリッチ社製）のD₂O（アルドリッチ社製）溶液（600 μ l）を5mm ϕ のNMRチューブに入れ、1-プロパンチオール（東京化成社製）をN-メチルプロピルアミンとのモル比にしておよそ1:1になるように加え、¹H NMRスペクトルでその変化を観察した。

(2) 結果

以下にN-メチルプロピルアミンおよび1-プロパンチオールを加えた後のN-メチルプロピルアミンの化学シフト値を示す。

¹H NMRスペクトルデータ（400MHz, D₂O, 室温）

N-メチルプロピルアミン

δ / ppm

- 0.81（プロピル基のメチル水素）
- 1.40（プロピル基の β 位のメチレン水素）
- 2.23（メチル基）
- 2.43（プロピル基の α 位のメチレン水素）

1-プロパンチオール

δ / ppm

- 0.87（プロピル基のメチル水素）
- 1.53（プロピル基の β 位のメチレン水素）
- 2.45（SH基に隣接したメチレン水素）

各々を混ぜ合わせた後のN-メチルプロピルアミン

δ / ppm

- 0.87（プロピル基のメチル水素）
- 1.54（プロピル基の β 位のメチレン水素）
- 2.49（メチル基）

2. 75 (プロピル基の α 位のメチレン水素)

各々を混ぜ合わせた後の1-プロパンチオール

δ / ppm

0. 84 (プロピル基のメチル水素)

1. 44 (プロピル基の β 位のメチレン水素)

2. 35 (SH基に隣接したメチレン水素)

この結果、モデル化合物であるアミンとチオールの両者を混ぜることによってN-メチルプロピルアミンに帰属されるシグナルはその化学シフトが低磁場シフトし、1-プロパンチオールに帰属されるシグナルはその化学シフトが高磁場シフトするという変化が観測された。特にアミノ基およびメルカプト基に近い部位のシグナルはよりそのシフト量が大きかった。

【0098】

〔実施例11〕

実施例1と同じ方法でスライドガラスを洗浄し、N-メチルアミノプロピルトリメトキシシラン(チッソ(株)社製)を0.3重量%になるように溶解して20分間攪拌し、この水溶液にスライドガラスを20分間浸漬させた後取り出して水で洗浄し、オープン中に入れ120℃で1時間乾燥させた。このスライドガラスに実施例2と同様の方法で配列番号1のプローブをスポットした。

【0099】

塩化ナトリウム濃度が0, 100, 300, 500, 1000mMになるよう塩化ナトリウムを10mMリン酸バッファーで溶解させ、作製したDNAチップをこれらの溶液で洗浄した。洗浄方法はこれら溶液で超音波照射2分行った後に、同溶液でリンスし、同溶液中で1晩攪拌した。

【0100】

洗浄したDNAチップを実施例2と同様の方法でブロッキング、ハイブリダイゼーション反応を行い、蛍光観察を行った。

【0101】

図1に示すように塩濃度が変化しても蛍光強度に影響はなく、イオン結合でも安定にプローブを固定することが可能であることが実証された。

【 0 1 0 2 】

【発明の効果】

本発明によれば、プローブを簡便な方法で基材に固定することができ、イオン強度が変化しても安定なプローブ担体を提供することができる。

【 0 1 0 3 】

また、プローブを核酸プローブとすることで、1塩基ミスマッチも検出可能なDNAチップの製造ができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 1 の結果を示す図である。

【配列表】

<110> Canon Kabushiki Kaisha

<120> PROBE CARRIER AND METHOD OF PRODUCING SAME

<130> CF017416W0

<150> JP 2002-211147

<151> 2002-07-19

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

<400> 1

actggccgtc gttttaca

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

<400> 2

actggccctc gttttaca

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

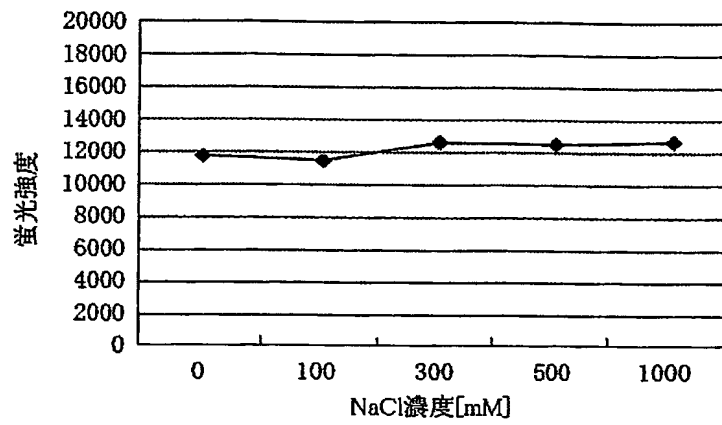
<400> 3

actggccgtc gttttaca

18

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブを基材に固定するために行う処理工程数を削減し、簡便にプローブの固定を行うプローブ担体の製造方法を提供する。

【解決手段】 プローブが基材に固定されたプローブ担体の製造方法であって、前記基材を用意する工程と、基材に導入された塩基性基と酸性基を有するプローブとを接触させることで前記基材に固定することを特徴とするプローブ担体の製造方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-197920
受付番号	50301180595
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 7月22日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001007
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号
【氏名又は名称】	キャノン株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100090538
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キャノン株式会社内
【氏名又は名称】	西山 恵三

【選任した代理人】

【識別番号】	100096965
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キャノン株式会社内
【氏名又は名称】	内尾 裕一

特願 2003-197920

出願人履歴情報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日

1990年 8月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名

キヤノン株式会社